

地衣類 추출물을 섭취한 흰쥐 간의 산화적 인산화 과정 및 대사물 측정(Ⅱ)

안 미 정 · 서 정 순 · 이 인 자 · 조 성 희

효성여자대학교 식품영양학과
(1985년 2월 17일 접수)

Effect of Water Soluble Extract of Lichens on Oxidative Phosphorylation and Level of Metabolite in Rat Liver

Mi-Jung An, Jung-Soon Suh, In-Ja Lee, Sung-Hee Cho.

Department of Food Science and Nutrition, Hyosung Womdn's University
(Received February 17, 1985)

Abstract

This study was conducted to examine the pharmacological effect of water soluble extract of Lichens (*Parmelia*, *Physcia* and *Cladonia species*) on liver-damaged rat by CCl_4 injection. Rat livers were damaged acutely and chronically by one-time injection of CCl_4 just prior to five days of experimental period and continuous injections in every three days for eight weeks of experimental period, respectively. During each period the experimental group was fed Lichens extract(5.5 mg of dry wt/ml) instead of water given to the control group. For both acute and chronic liver damage, the experimental group showed higher oxidative activity of hepatic mitochondria measured by state 3 respiration, P/O ratio, respiratory control and ATP synthesized, compared to the control group. Serum glucose was slightly higher in the experimental group but liver glycogen showed no significant difference between experimental and control groups. In experimental group, liver glucose-6-phosphatase activity was increased during first two days after acute liver damage, but not significantly different from control group during chronic damage. Liver lactate, malate plus fumarate and glutamate tended to be higher in the experimental group, especially for chronic liver damaged rat. It is concluded that Lichens extract stimulate cytoplasmic and mitochondrial oxidative activities and the possible mechanism of the latter is supposed to involve the preservation of membrane integrity by certain component(s) of water-soluble Lichens extract.

서 론

지의류(lichens)는 은화(隱花)식물에 속하며 균류(菌類)와 조류(藻類)가 공생하는 일종의 복합식물군

으로써 기원전 17세기 고대 이집트에서 민간약으로 이용하기 시작하여¹⁾ 강장약(強壯藥) 등 여러 용도로 사용되었다. 前논문²⁾에서 지의류(lichens)의 섭취가 CCl_4 에 의한 간손상에 대해 어느 정도 예방 및 치료 효과가 있음을 GOT, GPT, 5'-nucleotidase 효소활성

도와 혈액성분 및 핵산함량을 측정함으로써 지적되었다. 간독소(hepatotoxin)로 알려진^{3,4)} CCl₄는 대체로 모든 장기의 무게를 증가시키고, 세포막지질의 산화를 일으켜서⁵⁾ 막손상을 초래하므로 세포막 투과성이 함진되고, 또 간조직의 ATP를 분해하여 그 함량이 감소된다고 알려져 있다.⁶⁾

본 연구는 前논문³⁾과 같은 조건에서 간장조직의 미토콘드리아의 기능을 조사하고 에너지대사에 미칠 수 있는 영향을 고찰하고자 시도되었다. 즉 CCl₄로 간손상을 일으킨 흰쥐에서 지의류 추출물을 단기간 및 장기간 섭취하게 한 후 간장조직의 mitochondrial respiration을 조사하고 동시에 간장조직의 glycogen, lactate, malate와 fumarate, glutamate, glucose-6-phosphatase 활성 및 혈청 glucose를 측정하여 지의류(lichens) 추출물이 손상된 간의 대사에 미치는 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

실험동물의 사육, 실험식이, 지의류의추출 및 시약등은 前논문³⁾과 동일하다.

2. 분석시료의 준비 및 대사물 측정

흰쥐를 금성, 단성으로 간장애를 일으켜 사육한 후 前논문³⁾과 동일한 방법으로 혈액과 조직을 채취하였다.

1) Mitochondria의 분리

간장조직 約 1g을 前논문³⁾과 같은 방법으로 처리하여 얻은 mitochondria 침전물을 냉용액에 분산시켜 8,800×g에서 다시 냉동원심분리하여 이때 얻어진 간조직의 mitochondria에 다시 sucrose/EDTA 냉용액 0.3ml를 분산시켜 respiration 조사에 사용하였다.

2) Mitochondrial respiration 측정

Mitochondria의 산소소모량 및 respiratory control 지수는 Gilson oxygraph를 사용하여 측정하였다. Table 1은 간장조직에서 분리한 mitochondria의 respiration을 측정할 때의 medium조성을 표시한 것으로 총 2ml 용액내에 KCl 110mM TRIS(pH 7.4) 33 mM, MgCl₂ 5 mM로 구성되었으며 glutamate (5 mM)를 기질로 사용하였고 TCA촉매 물질로 malate (0.5 mM)를 사용하였다. mitochondrial respiration

Table 1. Composition of mitochondrial respiration medium

KCl	110 mM
TRIS(pH 7.4)	33 mM
MgCl ₂	5 mM
K ₂ HPO ₄	5 mM
Glutamate	5 mM
Malate	0.5 mM
Liver Mito. Suspension	0.05 ml(1.0~3.0 mg)
ADP	0.02 ml(200 μ moles)

Final volume of the reaction mixture was adjusted to 2.0 ml

에 사용한 간장조직의 mitochondrial protein은 1~3 mg/0.05 ml 이었고 ADP는 200 μmole을 후에 첨가하였다.

mitochondrial respiration측정은 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 기본 medium (Table 1)의 초기 산소의 함량은 37°C에서 1 ml 당 390 ng atom⁷⁾으로 추정하여 이용하였다. 이 기본 medium에 mitochondrial suspension (1~3 mg protein)을 가한 후 state 3 respiration은 ADP 200 μ moles을 첨가하여 야기시켰다. ADP 소모후 완만해지는 state 4 respiration과 state 3 respiration으로부터 respiratory control(R. C = I / II)를 산출하였고 P/O ratio는 200 μ moles의 ADP를 인산화시키는 과정에 소모된 산소의 양으로부터 계산되었다. 이때 합성된 ATP의 양은 P/O × state 3 respiration (I)으로써 계산하였다.

3) 간장의 Glycogen 측정

냉동된 조직분말을 30% KOH로 분해한 다음 95% ethanol에 의하여 glycogen을 침전시켜 2N H₂SO₄로 가수분해하여⁸⁾ 생성된 glucose를 hexokinase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase반응⁹⁾을 통하여 측정하였다.

4) 간장조직의 Lactate, Malate와 Fumarate, Glutamate 측정

냉동된 간조직의 분말을 2N HClO₄ (3 volume)로 추출한 다음 4M K₂CO₃로 중화시켜 lactate dehydrogenase,¹⁰⁾ malate dehydrogenase와 fumarase,¹¹⁾ glutamate dehydrogenase¹²⁾를 이용한 효소반응으로 생성되는 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 혈청의 Glucose 측정

대동맥에서 채취한 혈액을 3500 rpm에서 원심분리하여 얻어진 혈청 glucose oxidase와 peroxidase효소반응¹³⁾을 이용하여 측정하였다.

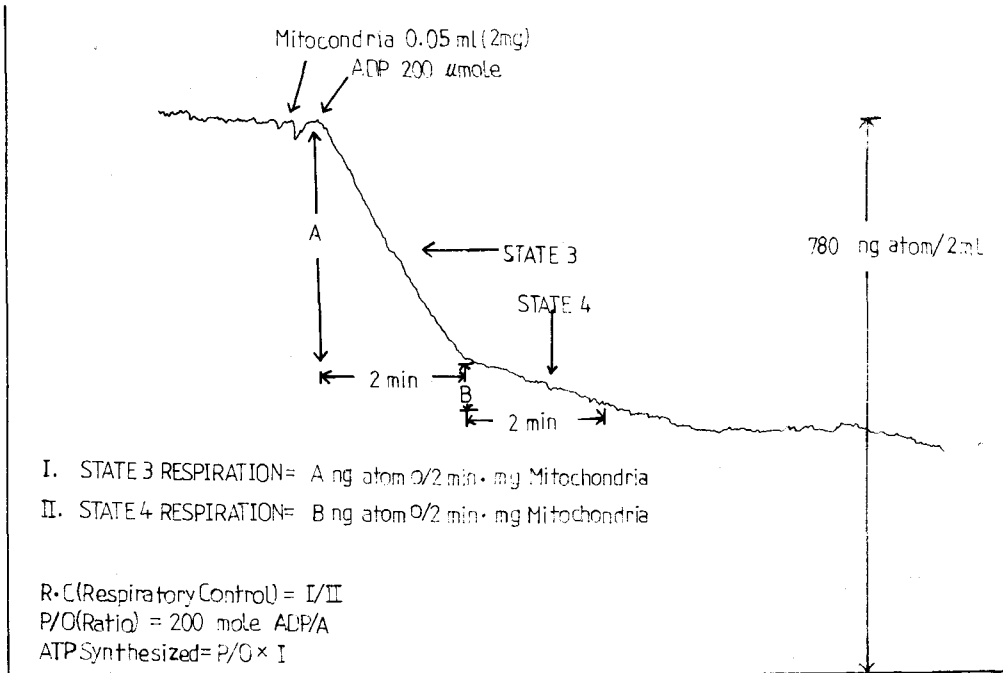


Fig. 1. Determination of mitochondrial respiration parameters

6) Glucose-6-phosphatase 활성도 측정

간장조직의 glucose-6-phosphatase의 활성은 Baginski 등¹⁴⁾의 방법에 의하여 sucrose/EDTA (0.25M/1 mM), glucose-6-phosphate disodium salt (0.1M), cacodylate buffer (0.1 M, pH 6.5)를 함유하는 반응액 0.3 ml에 간장조직의 PMS²⁾ 0.5 ml을 넣고 잘 혼합한 후 37°C의 항온수조에서 3분간 반응시켜 생성되는 Pi 양을 측정함으로써 효소활성을 조사하였다.

7) 단백질 정량 및 통계 처리법

前²⁾논문과 같은 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. Mitochondrial Respiration

CCl₄에 의해 급성 간장장애를 받은 흰쥐의 간장조직 내 mitochondria내의 state 3 respiration, P/O ratio, respiratory control과 합성된 ATP를 Fig. 2에 표시하였다. Fig. 2에서 보는것과 같이 초기 2일에는 전반적으로 다 낮은 값을 보이다가 5일에 가서 높은 값을 보였다. 이것은 초기에 CCl₄를 주었으므로 간장이 손상된 것으로 생각되며 5일에는 비교적 충분한 회복상태에 있으므로 초기보다 높은 값을 나타낸

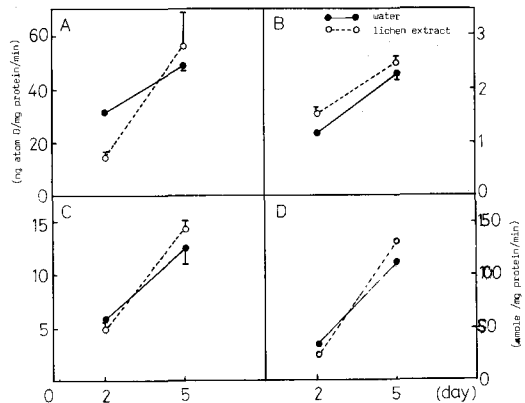


Fig. 2. Effect of lichens extract on oxidative activity of hepatic mitochondria isolated from rats with acute liver damage induced by CCl₄

A; State 3 respiration, B; P/O ratio
C; Respiratory control, D; ATP synthesized

것 같다. 특히 5일째 지의류 추출물을 섭취한 실험군이 대조군보다 모든 respiration parameter가 높은 값을 가지는 것이 유의할 만하다 하겠다.

다음으로 Fig. 3에서는 계속적으로 8주동안 3일 간격으로 CCl₄를 투여하여 만성 간장장애를 일으켰을

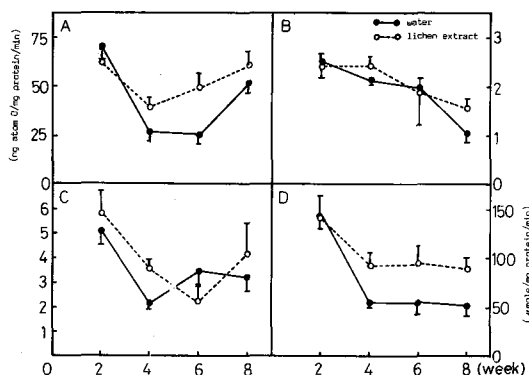


Fig. 2. Effect of lichens extract on oxidative activity of hepatic mitochondria isolated from rats with chronic liver damage induced by CCl_4

A; State 3 respiration, B; P/O ratio

C; Respiratory control, D; ATP synthesized.

때 후반기에 모든 respiration parameter 값이 낮은 것을 볼 수 있다. 이것은 CCl_4 를 장기 투여함으로써 간의 손상이 지속적으로 일어나 간의 상태가 점점 악화되는 것으로 생각된다. 그러한 과정에서 state 3 respiration과 ATP 합성이 지의류(lichens) 섭취군이 물을 섭취한 대조군보다 높았다는 것은 특기할 만하다 하겠다. P/O ratio와 respiratory control의 값은 변화가 심해서 실험군은 대조군과 통계적인 유의성은 적으나 8주후에는 역시 실험군이 높은 경향을 가지는 것으로 판단된다.

또한 CCl_4 에 의한 간손상의 정도는 혈청 GOT, GPT의 5~7배 증가로 前연구자논문(2)에서 이미 보고된바 있다. 이 CCl_4 의 조직손상기전은 free radical(CCl_4) 반응에 의한 세포막 구성 지방산의 과산화과정이라고 알려져 있다.³⁾

본 실험에서 조사한 mitochondrial respiration은 membrane-dependant process이므로 CCl_4 에 의한 membrane의 손상에 의하여 그 작용에 많은 영향을 받을 것이라는 것이 추정된다. 이것은 급성 간장애를 받은 2일 및 만성 간장애의 결과에서 보여준 바와 같이 측정된 모든 mitochondrial respiration parameter가 낮은 값을 가졌다는 것으로 분명히 입증되었다. 이러한 과정중 지의류(lichens) 추출물의 섭취군이 respiration 기능을 대조군보다는 원활히 진행시켜 줄 수 있다는 점은 본 실험결과에서 매우 중요하다. 이미 前논문결과(2)에서 나타났듯이 CCl_4 에 의한 간손상후 혈청 GOT, GPT의 증가가 지의류(lichens)의 약리효과의 한 측면을 분명히 제시하고 있다 하

겠다. mitochondrial respiration은 많은 membrane-bound protein이 참여하는 복합적인 기전이므로 어느 과정에서 특히 지의류가 CCl_4 에 대한 보호 작용을 하는지는 지적하기 어려우나 모든 respiration parameter에 대해 positive effect를 갖는 것과 CCl_4 의 손상기전을 고려할 때 membrane bound-protein의 전반적인 기능구조유지에 관계되는 membrane lipid 구조보존이 가장 유력한 가설로 여겨진다. 이러한 시점에서 볼 때 지의류(lichens)의 membrane 지질산화 방지 효과가 이 연구에 뒤를 이어 시급히 수행되어야 할 과제로 사려되며 동시에 membrane 지질구조변화도 앞으로의 중요한 연구내용이라 하겠다.

2. 간장대사를 및 혈청 Glucose의 변화

급성, 만성으로 간손상을 받은 흰쥐간의 lactate, 혈청 glucose와 glucose-6-phosphatase활성의 변화를 보면 Table 2에서 보는바와 같이 간장조직의 lactate는 실험군이 대조군보다 상당히 높았으며 특히 해당과정의 최종산물임을 고려할 때 mitochondrial respiration을 통한 산화과정뿐 아니라 해당과정도 촉진시켜 지의류(lichens)는 일반적으로 energy생산을 증가시키는 작용을 가진것 같다. 혈청 glucose도 급성, 만성으로 간장애를 받은 흰쥐 모두 실험군이 대체로 높았다. 여기서 혈당상승작용이 약간 있다고 생각되나 glycogen 분해촉진으로 보기 어렵다. 또한 glucose-6-phosphatase의 효소활성도는 간손상후 급성 1,2일에 약간 증가하다가 5일에는 대조군과 비슷하였으며, 만성에서는 큰차이는 없으나 약간 증가했음을 알 수 있고 혈청 glucose와 직접적인 관련을 맺을수 없어 여기에 대해 보다 자세한 연구가 필요하다 하겠다.

3. 간장조직의 Malate와 Fumarate, Glutamate

간장조직의 malate와 fumarate, glutamate 모두 만성 간장애를 받은 쥐의 실험군이 대조군보다 대체로 높은 값을 유지하였으며 (Table 3) 지의류(lichens)는 citric acid cycle 대사물의 농도를 약간 증가시켜 주는 효과가 있음을 알 수 있다. 일반적으로 citric acid cycle 대사물의 합량과 mitochondrial respiration은 모두 조직의 산화능력을 나타내 주는 지표이므로 지의류(lichens)는 영양소의 산화과정을 촉진시켜 energy대사를 원활히 해줄 것으로 사료된다.

Table 2. The levels of serum glucose hepatic lactate and glucose-6-phosphatase from liver-damaged rats with or without lichens extract feeding

Group	Acute Liver Damage				Chronic Liver Damage			
	1	2	5(day)	2	4	6	8 (week)	
Serum glucose (mg/100ml)	C	23.00±1.07	21.70±0.7	26.60±2.00	22.50±1.15	35.75±1.00	29.97±0.47	34.48±1.12
	E	21.11±0.05	25.84±1.11	32.27±0.10*	21.54±0.18	31.16±2.47	34.32±1.91	37.22±0.08*
Liver lactate (mole/g. wet. wt)	C	8.61±1.17	8.15±0.58	3.48±0.41	3.49±0.06	2.08±1.22	7.95±0.40	10.52±1.09
	E	6.55±1.39	9.00±1.15	10.85±0.95	4.84±0.46	2.54±0.48	8.79±0.48	12.69±0.41
Liver glucose-6-phosphatase (n mole Pi/min/mg PMS protein)	C	34.0±3.6	42.0±5.7	92.0±2.7	29.2±3.6	54.5±5.5	20.0±2.1	37.5±12.7
	E	66.8±6.3*	65.8±8.4*	85.0±3.8	39.3±11.0	56.3±11.0	19.4±3.2	47.5±12.8

Each value represents the mean value obtained from 5-7 rats±S.E.M.

C; Control (water), E; Experiment (lichen extract)

* p<0.001 significantly different from control group.

Table 3. The levels of malate plus fumarate and glutamate in rat liver-damaged by CCl₄ with or without lichens extract feeding

Group	Acute Liver Damage			Chronic Liver Damage				
	1	2	5 (day)	2	4	6	8 (week)	
Malate + umarate	(μmole/g• wet. wt)							
C	0.68±0.12	0.45±0.05	0.74±0.10	0.81±0.09	0.41±0.11	0.37±0.05	0.44±0.08	
E	0.48±0.09	0.52±0.11*	0.43±0.04	0.79±0.11	0.70±0.10**	0.27±0.01	0.68±0.06**	
Glutamate	C	1.56±0.25	2.31±0.80	3.10±0.77	0.99±0.15	0.92±0.32	1.08±0.14	0.89±0.17
	E	1.32±0.50	1.32±0.18	2.34±0.62	0.57±0.10	1.46±0.16	1.41±0.21	1.42±0.10**

Each value represents the mean value obtained from 5-7 rats±S.E.M.

C; Control (water), E; Experiment (lichens extract)

* P<0.01 significantly different from control group

** P<0.001 significantly different from control group.

V. 요약

지의류(lichens) 수용성 추출물에 약리적인 효과를 알기위해 CCl₄로 흰쥐의 간손상을 유도시킨후 단기간, 장기간 사육시켜서 간장조직의 mitochondrial respiration 측정을 하였고 간장조직내의 lactate, malate와 fumarate glutamate, 혈청 glucose 및 간장조직의 glucose-6-phosphatase의 활성도를 측정하였다. 그 결과 급성 만성적 간장애를 받은 쥐에서 4 가지 호흡지수(state 3 respiration, P/O ratio, respiratory control, 합성된 ATP)로 측정된 mitochondrial respiration 기능이 지의류(lichens) 추출물을 섭취한 실험군이 대조군 보다 높았고, serum glucose, 간장내의 lactate, glutamate, malate와 fumarate 및 glucose

-6-phosphatase 활성도 실험군이 높은값을 나타내었다. 이것으로 지의류추출물은 간장조직의 mitochondrial respiration에 대해 보호작용과 해당과정을 촉진하는 작용이 있다는 것으로 추정된다.

문헌

1. Vartia, K. O. : *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, **27**, 547(1949)
2. 조옥량·서정순·안미정·이인자·조성희 : 한국영양식량학회지 계재 신청(1985)
3. Robbins, S. L. and Contran, R. S. : *Pathologic Basis of Disease*, 2nd ed., W. B. Saunders, Co., Philadelphia, 31(1979)
4. 한국 약학대학 협의회, 약물학 분과회 : 약물학, (문성사, 서울), 570(1980)

5. Anderson, W. A. D. and Kissane, J. M.: *Pathology*, 7th ed., Mosby, St. Louis 94(1977)
6. 안현보 : 서울의대 잡지, **14**(3). 191(1973)
7. Chappel, J. B.: *Biochem. J.* **90**, 225(1964)
8. Good, C., Kramer, H. and Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 100. 485(1933)
9. Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F. and Stork, H.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd English ed., Academic Press, Inc., New York and London, **3**, 1196(1974)
10. Gawehn, K. and Bergmeyer, H. U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd English ed., Academic Press, Inc., New York and London, **3**, 1492 (1974)
11. Knop, W.: *Ann. Chem.*, **49**, 103(1844)
12. Bernt, E. and Bergmeyer, H. U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd English ed., Academic Press, Inc., New York and London, **4**, 1704 (1974)
13. Bergmeyer, H. U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd English ed., Academic Press, Inc., New York and London, **3**, 1206(1974)
14. Baginski, E. S., Foa, P. P. and Zak, B.: *Methods of Enzymatic Analysis* 2nd English ed., Academic Press, Inc., New York and London, **17**, 876(194)